



Functional Analysis of a Gene Cluster of Two Aliphatic-Aromatic Polyester Type Plastic Degrading Enzymes from Roseateles depolymerans strain TB-87

発行年	2019
その他のタイトル	脂肪族芳香族ポリエステル系プラスチック分解菌 TB-87株由来の2種の分解酵素遺伝子とその機能解析
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9285号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00158116

氏名	AZURA BINTI AHMAD		
学位の種類	博 士（生物工学）		
学位記番号	博 甲 第 9 2 8 5 号		
学位授与年月日	令和元年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Functional Analysis of a Gene Cluster of Two Aliphatic-Aromatic Polyester Type Plastic Degrading Enzymes from <i>Roseateles depolymerans</i> strain TB-87 (脂肪族芳香族ポリエステル系プラスチック分解菌TB-87株由来の 2 種の分解酵素遺伝子とその機能解析)		
主査	筑波大学教授	博士（学術）	中島 敏明
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学教授	博士（農学）	北村 豊
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海 真生

論 文 の 要 旨

プラスチック廃棄物による汚染は、近年におけるその利用産業の急速な成長によって引き起こされる大きな環境問題の1つである。特に海洋における微細な残存プラスチック（マイクロプラスチック）などは現在世界規模で重大な環境問題として認識されており、その対策が急務とされる。これらの廃棄物に関連する多くの問題を克服するために、生分解性プラスチックの開発が現在注目を集めている。これらは適切な微生物によって低分子化され、最終的に二酸化炭素やメタン、水等は無機化される。さらに、分解の過程でモノマーを生成することでリサイクルが可能となり、より経済的で環境に優しいアプローチとしても期待されている。この目的を達成するためには、まず微生物による生分解メカニズムを解明する必要がある。

著者は、本論文の第1章でこれら諸問題について解説したうえで、これまでに知られているプラスチック分解菌、分解酵素について総合的にまとめ、これらの諸問題の解決に向けたプラスチック分解酵素の構造的特徴と分解性についての総合的知見を得ることの意義を明らかにしている。

次いで、著者は第2章において、所属研究室で分離されたプラスチック分解菌、*Roseateles depolymerans* TB-87株由来の2種のプラスチック分解酵素遺伝子について、ゲノムシーケンスに基づく解析を行った。本菌株由来の2種のプラスチック分解酵素（Est-HおよびEst-L）は、互いに類似した基質特異性および分解活性を示し、かつ同一の分子量を有するが、内部アミノ酸の配列データから、両者は異なるポリペプチド鎖からなるタンパク質であることが示唆されていた。著者はゲノム解析とアノテーションデータ、及び内部アミノ酸配列のデータから両遺伝子を特定し、それぞれ360（Est-H）および289（Est-L）アミノ酸をコードする、2種のプラスチック分解酵素遺伝子を得ることに成功した。これらの遺伝子は極めて近い位置に存在し、その間には244アミノ酸からなる未知のシャペロン様タンパク質（Est-Ch）をコードする別のORFが存在することが明らかとなった。また、ホモロジーサーチを行い、本酵素がク

チナーゼのグループに属する酵素であることを明らかにした。これらの酵素遺伝においては1種の菌で複数の酵素遺伝子を持つものは報告されていたが、複数の酵素がシャペロン様タンパク遺伝子を挟んでタンデムに存在する例は示されておらず、本研究で初めて報告された。

第3章において、著者はこれらのタンパクの大腸菌での発現を試みた。種々の大腸菌宿主-ベクター系を用いて検討したところ、Lemo21(DE3)を宿主とした場合に発現が認められたが、封入体を形成しており活性は確認できなかった。これらについてさらにリフォールディングを試みたが、活性のあるタンパク質を回収することはできなかった。プラスチック分解酵素はプラスチック表面との結合に疎水性相互作用が関与する。そのため発現しても直ちに凝集・構造変化が起こりやすく、一般的に大量発現が困難であるため、大腸菌での発現は現状では不可能であると結論づけた。

第4及び第5章では、著者はTB-87株染色体上のプラスチック分解酵素の破壊を試みた。遺伝子破壊を行うことにより、現在確認されている配列がプラスチック分解酵素遺伝子であることが確認でき、さらには、破壊株を宿主にした発現系を構築することで、大腸菌では不可能だったプラスチック分解酵素の発現が可能になる可能性が高い。そこで、カナマイシン耐性カセットを用いて、推定プラスチック分解酵素遺伝子クラスター全体を破壊した。変異株は、生分解性プラスチック（ポリブチレンサクシネート-co-アジペート）エマルジョンを重層したNutrient Broth寒天プレート上でのハロー形成能を失っており、本領域がプラスチック分解酵素遺伝子であることを強く示唆していた。

最後に、著者は第6章において研究全体を総括したうえで本研究のプラスチック分解酵素における研究分野との関わりを明確にした上で、今後の方向性について考察している。

審 査 の 要 旨

プラスチックは一部天然物由来のものを除いて、ほとんどがゼノバイオティックスであり、その分解酵素は本来的には他のターゲットを有すると考えられている。ポリエステル型のプラスチック分解酵素としてはリパーゼやエステラーゼ、クチナーゼ等のグループが存在している。中でも耐熱性のクチナーゼグループの酵素には、これまで分解の報告がほとんど無いPET（ポリエチレンテレフタレート）分解能を持つものが報告されており、注目を集めている。本研究で同定された酵素はいずれも中温性であるが、報告されている高温性のクチナーゼ（PET分解能を有する）と高い相同性を持っており、両者の比較データと今回作成された破壊株を宿主とすることで耐熱化等のタンパク工学的改変を行うための環境が整った。またその遺伝子構造についても特異であり、2つの酵素は互いに極めて相同性は高いものの、異なる2種の遺伝子から翻訳されており、また間に存在するシャペロン様のタンパクの役割についても興味を持たれる。これらの成果は今後の生分解性プラスチック開発やその分解処理、リサイクルの分野において貴重な情報を提供する成果として評価できる。さらに、一般的にプラスチック分解酵素は異種生物での発現が困難であり、発現に成功した例も限られている。本研究でも困難な中で果敢に挑戦しており、その姿勢も合わせて高く評価できる。

令和元年7月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。